

© WPI / DERWENT

TI - **Magnetic** micro-support for eucaryotic cells cultivation - is obtd. by mixing specified oxide with gelatin pretreated with glutaraldehyde, grinding, and treatment with proteolytic ferment

PR - SU19874313664 19871006

PN - SU1567623 A 19900530 DW199105 000pp

PA - (ASBI-R) AS USSR BIOORG CHEM

- (BIOL-R) BIOLAR IND RES COMPLEX

IC - C12N5/00 ;C12N11/02

IN - LUKIN Y U V; MARKVICHEV E A; TURKIN S I

AB - SU1567623 **Magnetic** microsupport for cultivating the eucaryotic cells are obtd. more efficiently as follows. Fe, Co or Ni oxide is used as **magnetic** filler. The oxide is ground to 0.005-0.05 microns particle size, and mixed with gelatin pretreated with glutaraldehyde. The mixt. is then ground and treated with a proteolytic ferment until the particle surfaces become smooth. The ratio filler:gelatin is 1:0.5-10.

- USE/ADVANTAGE - In veterinary and medical field, esp. in prodn. of vaccines, prodn. of interferon, growth hormone etc. Simpler method and higher quality product. Bul.20/30.5.90 (4pp Dwg.No. 0/0)

OPD - 1987-10-06

AN - 1991-035151 [05]



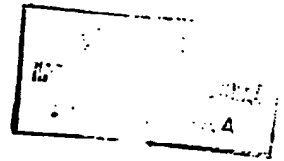
СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

(19) **SU** (11) **1567623** **A 1**

(51) **С 12 N 5/00, 11/02**

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ
ПРИ ГИИТ СССР

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ



(21) 4313664/31-13
(22) 06.10.87
(46) 30.05.90. Бюл. № 20
(71) Институт биоорганической химии
им. М. М. Шенякина АН СССР и Научно-
производственное объединение "Биолар"
(72) С. И. Туркин, Ю. В. Лукин, Е. А. Мар-
квичева, Р. А. Али-Зарде, В. П. Зубов,
М. А. Завальный, А. Г. Скуиньш, М. К. Ка-
лявиньш и А. Х. Цицманис
(53) 577.15 (088.8)
(56) Международная заявка, РСТ/SU
86/00083, кл. С 12 N 5/00, 1986.
Международная заявка, РСТ/US
81/01098, кл. С 12 N 11/10, 1982.

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ МАГНИТНЫХ МИКРОНОСИТЕЛЕЙ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК ЭУКАРИОТ
(57) Изобретение относится к биотехнологии, в частности к усовершенствованному способу получения магнитных микроносителей для культивирования клеток эукариот. Цель изобре-

2
ния - упрощение способа и улучшение качества целевого продукта за счет увеличения прироста клеток на микроносителях. Способ заключается в обработке раствора желатина поперечносшивающим агентом - глутаровым альдегидом, размельчении блок-полимера с целью получения частиц определенного размера и обработке полученных протеолитическим ферментом. При этом предварительно проводят введение в раствор желатина частиц магнитного наполнителя размером 0,005-0,05 мкм (оксидов металлов переменной валентности) в соотношении магнитного наполнителя и желатина 1:(0,5-10). На полученных таким способом микроносителях прирост клеток перевиваемой линии RH повышается в 1,6-2,5 раза по сравнению с микроносителями, полученными по известному способу. Упрощение способа достигается за счет исключения стадии дисперсионной конденсации. 2 з.п. ф-лы, 1 табл.

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к усовершенствованному способу получения магнитных микроносителей (ММН) для культивирования поверхностно-зависимых клеток эукариот, и может найти широкое применение в ветеринарной и медицинской промышленности для выращивания клеток и размножения вирусов на них с целью создания вакцин и сывороток, а

также для получения секретируемых клетками эукариот важных биологически активных веществ, таких как β - и γ -интерфероны, активатор плазминогена, гормон роста и др.

Цель изобретения - упрощение способа и улучшение качества целевого продукта за счет увеличения прироста клеток на микроносителях.

(19) **SU** (11) **1567623** **A 1**

Способ заключается в диспергировании магнитного накопителя (МН) на основе оксидов металлов переменной валентности с размером частиц 0,005-0,05 мкм в растворе желатина, обработке полученной суспензии глутаровым альдегидом и размельчении образующегося геля для получения частиц микроносителя. Последние обрабатывают протеолитическими ферментами до исчезновения шероховатости поверхности. В качестве оксидов металлов используют оксиды железа, кобальта и никеля, а соотношение магнитного носителя и желатина устанавливают равным 1:0,5 - 1:10. Использование предлагаемого способа позволяет значительно упростить процесс получения микроносителей за счет исключения стадии дисперсионной конденсации, на которой применяют специальную аппаратуру и органические растворители, а также улучшить качество целевого продукта за счет увеличения прироста клеток в 1,6-2,5 раза.

Пример 1. Соли, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (35 г) и $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (50 г), растворяют в 110 мл H_2O каждую, растворы объединяют и при перемешивании постепенно приливают 100 мл 25%-ной гидроокиси аммония. Выпадает тонкодисперсный осадок магнетита Fe_3O_4 , который трижды промывают подкисленной дистиллированной водой. К промытому осадку (25 г) добавляют 400 мл 25%-ного раствора желатина при 50°C в воде (весовое соотношение МН и желатина 1:4) и при перемешивании до однородной суспензии нагревают в течение 20 мин при 50°C. Средний размер частиц магнитного наполнителя 0,005 мкм. К образовавшейся суспензии добавляют 35 мл 25%-ного водного раствора глутарового альдегида и интенсивно перемешивают в течение 15 мин. После выдерживания в течение 15 мин при 20°C блок геля продавливают через сито с диаметром отверстий 200 мкм. Полученные частицы отмывают водой от глутарового альдегида, затем обрабатывают 200 мл 0,25%-ного раствора трибсина в 0,01 М фосфатном буфере (рН 7,6) в течение 3 мин при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Для удаления остатков фермента частицы микроносителя промывают 0,01%-ным раствором этилендиаминететрауксусной кислоты, суспендируют

в 0,15 М растворе NaCl , стерилизуют при 120°C и 0,7 ати в течение 20 мин. Получают 300 г ММН с содержанием 8,5% Fe_3O_4 . В процессе обработки ММН протеиназами осуществляют визуальный контроль под микроскопом и обработку ферментами ведут до исчезновения шероховатости частиц.

Пример 2. ММН получают по примеру 1, но на 5,0 г осадка Fe_3O_4 добавляют 200 мл 25%-ного раствора желатина (весовое соотношение МН и желатина 1:10). Получают 250 г ММН с содержанием 2% Fe_3O_4 .

Пример 3. ММН получают по примеру 1, но на 25 г осадка Fe_3O_4 добавляют 50 мл 25%-ного раствора желатина (весовое соотношение МН и желатина 1:0,5). Получают 125 г ММН с содержанием 25% Fe_2O_3 .

Пример 4. ММН получают по примеру 1, но к 4,1 г осадка Fe_3O_4 добавляют 200 мл 25%-ного раствора желатина (весовое соотношение МН и желатина 1:12). Получают 240 г ММН с содержанием 0,9% Fe_3O_4 .

Пример 5. К 25 г осадка Fe_3O_4 , который получен и промыт по примеру 1, при перемешивании и 50°C добавляют 200 мл 25%-ного раствора желатина в воде (соотношение МН и желатина 1:2). Полученную суспензию, содержащую частицы МН - Fe_3O_4 - с размером 0,005 мкм, подвергают дальнейшей обработке, добавляя 35 мл 25%-ного водного раствора глутарового альдегида. Далее весь процесс проводят по примеру 1. Получают 350 г ММН с содержанием 16,2% Fe_3O_4 .

Пример 6. Соли, 54 г $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ и 24 г $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, растворяют в 50 мл воды каждую, растворы объединяют, нагревают до 90°C и при перемешивании приливают 150 мл 25%-ного раствора гидроокиси натрия. Перемешивают в течение 10 мин. Образовавшийся осадок CoFe_2O_4 с размером частиц 0,03 мкм промывают раствором соляной кислоты (0,05 М) до рН 6-8. К промытому осадку добавляют 400 мл 20%-ного раствора желатина в воде (соотношение МН и желатина 1:3), перемешивают до образования однородной суспензии и нагревают в течение 30 мин при 90°C. Все дальнейшие операции, начиная с добавления 35 мл 25%-ного раствора глутарового альдегида, осуществляют по примеру 1. Получают

400 г ММН с содержанием 6,4% феррита кобальта.

Пример 7. Соли, 54 г $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ и 20 г NiCl_2 , растворяют в 50 мл воды каждую, растворы объединяют и нагревают до 90°C . При перемешивании добавляют 150 мл 25%-ного раствора гидроксида натрия и продолжают перемешивание в течение 40 мин при той же температуре. Образовавшийся осадок (NiFe_2O_4 с размером частиц 0,05 мкм) промывают раствором 0,05 М соляной кислоты до pH 6-8. К промытому осадку добавляют 400 мл 20%-ного раствора желатина (соотношение МН и желатина 1:3), перемешивают до образования однородной суспензии и нагревают в течение 30 мин при 90°C . Все дальнейшие операции, начиная с добавления 35 мл 25%-ного раствора глутарового альдегида, осуществляют по примеру 1. Получают 410 г микроносителя с содержанием 6,8% феррита никеля.

Пример 8. Процесс осуществляют по примеру 1, но полученные частицы после отмытки водой от глутарового альдегида обрабатывают 20 мл 0,20%-ного раствора α -химотрипсина в 0,01 М фосфатном буфере, pH 7,6. Получают 295 г ММН с содержанием 8,5% Fe_3O_4 .

Пример 9. Гранулы микроносителя, полученные по примеру 1, помещают в 0,25%-ный раствор коллагеназы в 0,15 М фосфатном буфере с pH 7,6 (из расчета 200 мл раствора фермента на 250 г гранул микроносителя) и выдерживают, перемешивая при комнатной температуре до образования гладкой поверхности гранул, которое фиксируют визуальным наблюдением под микроскопом. Время обработки 3,5 мин. Затем остатки фермента удаляют, а продукт промывают по примеру 1.

Оптимальное весовое соотношение МН и желатина 1:(0,5-10). Получение ММН при весовом соотношении менее 1:0,5 затруднительно из-за возрастания вязкости раствора, а при соотношении более 1:10 нецелесообразно, так как приводит к получению частиц с низким содержанием МН (менее 2%), а также к снижению прироста клеток.

Использование частиц МН менее 0,005 мкм невозможно, так как этот размер имеет однодоменная частица МН, а более 0,05 мкм нежелательно, так как уменьшается прирост клеток.

С целью получения гладкой поверхности магнитного микроносителя, которая необходима для эффективного прикрепления клеток, частицы микроносителя обрабатывают протеолитическими ферментами. Используют трипсин, α -химотрипсин и коллагеназу при концентрации 0,2-0,25%. В процессе проведения обработки осуществляют визуальный контроль под микроскопом за поверхностью гранул и обработку ферментом ведут до исчезновения шероховатости поверхности. Это время составляет обычно 2,5-3,5 мин. Более длительная обработка нежелательна, так как при этом разрушаются гранулы микроносителя. Нежелательно также использование более высоких концентраций ферментов ввиду того, что сокращается время обработки, что создает сложность в установлении момента окончания этой стадии.

На микроносителях, полученных согласно примерам 1-9, выращивают поверхностно-зависимые клетки почек эмбриона человека перевиваемой линии RH. Культивирование проводят на среде 199, содержащей 3-10% бычьей сыворотки, во флаконах объемом 250 мл с магнитной мешалкой. Клетки высевают, используя на начальном этапе 20% объема (30 мл) питательной среды от конечного. После засева клеток суспензию периодически перемешивают по 1-2 мин с интервалом 30 мин в течение 3-4 ч. По окончании процесса прикрепления клеток к микроносителям объем среды доводят до конечного (150 мл), концентрация клеток при этом составляет $4,0 \cdot 10^4$ кл/мл, и устанавливают постоянный режим работы мешалки - 40 об/мин. Концентрация микроносителей в конечном объеме среды составляет 1 см³ плотного осадка на 10 мл питательной среды, что обеспечивает площадь около 15 см² на 1 мл среды. Процесс культивирования осуществляют при 37°C в течение 7 сут. На 3 сут культивирования среду заменяют на 70%. По окончании процесса клетки снимают, обрабатывая их 20 мл раствора, содержащего 0,025% трипсина и 0,02% ЭДТА. Количество выросших клеток определяют, подсчитывая их в гемоцитометре после окрашивания трипановым синим. Коэффициент прироста клеток рассчитывают по отношению

концентрации выросших клеток к их посевной концентрации.

В таблице приведены сравнительные данные по культивированию перевиваемой линии RH-клеток почек эмбриона человека.

Таким образом, предлагаемый способ позволяет упростить технологию получения магнитных микроносителей для культивирования клеток эукариот благодаря исключению стадий дисперсионной поликонденсации и улучшить качество микроносителей за счет увеличения коэффициента прироста клеток на предлагаемых магнитных микроносителях в 1,6-2,5 раза по сравнению с носителями, полученными по известному способу. Кроме того, магнитные микроносители, получаемые предлагаемым способом, содержат заданное количество магнитного носителя, что позволяет использовать их в процессе магнитоуправляемого культивирования.

Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

1. Способ получения магнитных микроносителей для культивирования клеток эукариот, включающий смешивание раствора желатина с магнитным наполнителем из оксидов металлов переменной валентности, получение частиц микроносителя с проведением обработки желатина глутаровым альдегидом, отличающийся тем, что, с целью упрощения способа и улучшения качества целевого продукта за счет увеличения прироста клеток на микроносителях, в качестве магнитного наполнителя используют частицы оксидов металлов переменной валентности размером 0,005-0,05 мкм, обработку желати-

на глутаровым альдегидом проводят перед получением частиц микроносителя, а частицы микроносителя получают размельчением геля с последующей обработкой их протеолитическими ферментами до исчезновения шероховатости поверхности.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что соотношение магнитный наполнитель и желатин устанавливают равным 1:0,5-1:10.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве оксидов металлов переменной валентности используют оксиды железа, кобальта или никеля.

Микроносители по примеру	Концентрация выросших клеток, кл/мл	Коэффициент прироста клеток
По известному способу	$1,6 \cdot 10^5$	4,0
По предлагаемому способу		
1	$3,8 \cdot 10^5$	9,5
2	$2,5 \cdot 10^5$	6,3
3	$2,6 \cdot 10^5$	6,5
4	$1,8 \cdot 10^5$	4,5
5	$4,1 \cdot 10^5$	10,2
6	$2,9 \cdot 10^5$	7,2
7	$3,2 \cdot 10^5$	8,0
8	$3,8 \cdot 10^5$	9,5
9	$3,6 \cdot 10^5$	9,0

Редактор М.Петрова Составитель В.Муронец
Техред М.Дидык

Корректор В.Кабаций

Заказ 1302

Тираж 495

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР
113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Производственно-издательский комбинат "Патент", г.Ужгород, ул.Гагарина, 101